

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 昭62-285781

⑫ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和62年(1987)12月11日  
C 12 N 5/00 7115-4B  
//C 12 N 5/00  
C 12 R 1:91) 審査請求 未請求 発明の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 細胞の培養法

⑮ 特 願 昭61-129419

⑯ 出 願 昭61(1986)6月4日

⑰ 発 明 者 吉 里 勝 利 海老名市大谷40-1-5-518  
⑱ 発 明 者 佐々木 憲 一 座間市相模が丘5-40-7  
⑲ 発 明 者 山 本 昇 相模原市若松6-14-5  
⑳ 発 明 者 高 山 敏 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究  
所内  
㉑ 発 明 者 宮 田 暉 夫 東京都目黒区中根2丁目11番21号 日本医用高分子材料研  
究所  
㉒ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号  
㉓ 出 願 人 株式会社高研 東京都新宿区下落合3丁目5-18  
㉔ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

### 明 細 書

#### 1. 発明の名称

肝細胞培養法

#### 2. 特許請求の範囲

(1) X線照射して増殖能力を停止させた線維芽細胞をフィーダー層として、これに初代肝細胞を重層培養することを特徴とする肝細胞培養法

(2) 細胞に親和性を有する有孔性薄膜の下に線維芽細胞をまき、この薄膜の反対側に肝細胞をまいて培養することを特徴とする肝細胞培養法

(3) 有孔性薄膜が有孔性コラーゲン膜である特許請求の範囲第2項記載の培養法

#### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は肝細胞の培養法に関する。

(従来の技術)

初代培養肝細胞は多様な肝機能の解明のために用いられている。このため、長期間培養する努力が払われ、比較的長く培養維持する方法として、コラーゲン膜上、ニトロセルローズ・フィルター

上、コラーゲン・ナイロンメッシュ上、ラット肝組織より分離したバイオマトリックス上などで肝細胞を培養する方法が用いられているが必ずしも成功していない。

また、線維芽細胞をフィーダー(feeder)細胞として何らかの成長因子および栄養の供給の役に利用するため、この細胞と初代肝細胞を混合して培養する方法(G. Michalopoulos et al.: In Vitro 15, 798 (1979))も行われている。

しかし、肝細胞以外の細胞と肝細胞を共に培養すると、両者が混存し、また肝細胞以外の細胞が著るしく増殖するため、肝細胞自身の機能の解明が制限されるのが実情であった。

(問題点を解決するための手段)

上記の問題を解決するために本発明者は、X線を照射し線維芽細胞の増殖を抑制すること、および透過性の高いコラーゲン膜の片側に線維芽細胞をその反対側に肝細胞をまいて両者を分離して培養する工夫を行って初代肝細胞を長期間培養維持し得る方法、および、それらを組合せた方法、を

発明した。

#### ( 構 成 )

本発明は、X線照射して増殖能力を停止させた線維芽細胞をフィーダー層として、これに初代肝細胞を重層培養することを特徴とする肝細胞培養法、および、細胞に親和性を有する有孔性薄膜の下に線維芽細胞をまき、この薄膜の反対側に肝細胞をまいて培養することを特徴とする肝細胞培養法、並びにこれらに有用なキットに関する。

初代肝細胞としては分離直後の肝細胞を用い、哺乳類、例えばラット、マウス、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等およびヒト由来の肝細胞を利用する。

線維芽細胞としては3T3、肝由来の線維芽細胞、皮膚由来の線維芽細胞等を用いることができる。

X線照射は通常のX線照射装置によつて行えばよく、照射量としては3000～10000radの範囲が適当である。これは細胞が増殖能力を失うが生存し得る状態となることを観察することによって

ことによって得られるアテロコラーゲンであってもよい。

塩類水溶液に浸漬して線維化させる時の塩類水溶液としては、pH5～9の緩衝液、例えばリン酸緩衝液でよく、生理食塩水等であっても良い。

培養液としては、初代肝細胞に用い得るものであればよく、例えば、表皮細胞培養用に開発されたグリーンメディウム(文献後記)等がある。

長期培養維持のために、ハイドロコーチゾン、デキサメサゾンを加えるとよいこともあり、その他インスリン、コレラトキシン、EGF(Epithelial growth factor)を加えることもある。

また、線維芽細胞の成育を抑えて肝細胞のみをよく増殖させるために、酸素分圧を40～50%にするのが効果的なこともある(Y.Koganei,K.Sato,K.Nagayoshi&K.Yoshizato:Proceeding of the 3rd Symposium on Cytoprotection,p99,Kyoto, Jan.28,1985)

さらに、温度等の培養条件は一般的なもの(例えば、朝日アライズ社発行「動物細胞利用実用化

適当量を決めることができる。

細胞に親和性を有する有孔性薄膜とは、細胞がよく付着し、その生存に悪影響を与えないこと、及び栄養分等を適度に透過させる孔があるものであればよく、例えば、コラーゲン(Exp.Cell Res. 94, 70(1975))、ニトロセルロース(Exp.Cell Res. 114, 307(1978))、コラーゲン・ナイロン(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 283(1979))などを挙げることができ、特にコラーゲンが好ましい。

有孔性コラーゲン薄膜は、例えば、コラーゲン溶液(通常0.3～0.6%, pH 2～4.5)を疎水性プラスチック上で風乾する等の方法でシート状にした後、塩類水溶液に浸漬して線維化させ、これに紫外線照射する等してコラーゲン線維に架橋を導入して製造することができる。

コラーゲンとしては、酸可溶性コラーゲン、または、天然コラーゲンを酸水溶液(酢酸、クエン酸、乳酸、塩酸等)中で、プロテアーゼ(ペプシン等)で処理して、コラーゲン分子末端のテロペプチドを除去すると同時に、分子架橋を切断する

マニュアル」141～150頁参照)を参考にすることができる。

#### (発明の効果)

この方法を用いれば肝細胞を長期間培養維持でき、さらに、必要に応じて肝細胞だけを分離し、採取することが可能になり、肝細胞の機能解明に寄与するところは大きい。

本発明の方法の利用のため、細胞に親和性を有する有孔性薄膜の両面に、それぞれ線維芽細胞と初代肝細胞を置き、培養液を加えた肝機能試験用キットまたはこれを凍結保存したものを予め作成しておくことと便利であり、これらの試験用キットも本発明のうちである。また、有孔性薄膜とX線照射した線維芽細胞を組合せて用いることも本発明のうちである。

以上本発明を一般的に述べてきたが、さらに実施例にてラット肝細胞の長期培養方法について詳細に説明する。ただし、この実施例は本発明の具体的例示であって、本発明を限定するものでないことは言うまでもない。

## 実施例

## (1) 培養液

グリーン (H.Green) の表皮細胞における方法 (N.Eng.J.Med., 311 448-451 (1984)) に従って、DME (Dulbecco's modified Eagle Minimum Essential Medium) とハムの F-12 培養液を 3:1 に混合したものに、10% 牛胎児血清 (FCS)、0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ハイドロコルチゾン、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インシュリン、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トランスフェリン、 $2 \times 10^{-9}\text{M}$  トリヨードチロニン、 $10^{-10}\text{M}$  コレラトキシン、 $8 \times 10^{-4}\text{M}$  アデニンを添加して使用した。また培養 4 日目より 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EGF を添加した。

なお、DME、F-12 培養液には 10mM  $\text{NaHCO}_3$ 、20mM HEPES、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン、100 units/ml ペニシリンが含まれる。

## (2) コラーゲン薄膜の作製

コラーゲン溶液 (磯高研製アテロコラーゲン、pH3) の一定量を疎水性プラスチック上にのせ、風乾してシート状とした後、生理食塩水中で 37°C に 1 時間加温し次いで UV 照射した。風乾後、コラー

ゲンを薄膜として回収し枠へはめこんで、細胞培養に供した。

## (3) 有孔性コラーゲン薄膜下面への線維芽細胞の付着

線維芽細胞は、10% FCS、10mM  $\text{NaHCO}_3$ 、20mM HEPES、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン、100 units/ml ペニシリンを含む DME 培養液を用いて継代培養しておいたものを、0.1% トリプシン、1mM EDTA 処理で剥離し、同培養液に分散した。培養液中の細胞密度を  $8 \times 10^5$  cells/ml に調整し、遠心管に分注して氷水中で放射線 (6000rad) を照射した。

遠心 (1500 rpm, 7分) により細胞を沈殿させ、上清を同量の新鮮な培養液と交換し、再び細胞を分散した。有孔性コラーゲン薄膜下面を上向きにして、各 2 ml の細胞を含む培養液をまいた。線維芽細胞は、肝細胞をまくまで 1 日間そのまま 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C で培養した。

## (4) 有孔性コラーゲン薄膜上へのラット肝細胞の播種

ラット (Sprague-Dawley 雄、6週齢 150~200g)

を用いセグレンのコラーゲン灌流法 (P.D.Seglen, Method in Cell Biology 13, 29-83 頁, Academic Press (1976)) に準じて肝実細胞を調整した。得られた肝実細胞は、先に述べたグリーンの培養液に分散し、有孔性コラーゲン薄膜上面に  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度になるように播いた。培養は 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C でおこない、培養液の交換は週に 2 回おこなった。

## (5) 肝細胞の形態と機能

コラーゲン薄膜上に接着した肝細胞は、伸展して敷石状に並びシートを形成した。シート中には分裂像が観察され、培養 2 週間まで、シートは大きくなった。その後肝細胞は、培養 4 週間以上著しい形態的な変化もなく維持された。

肝細胞のアルブミンの生産を、酵素抗体法により調べたところ、培養 4 週間を通じて、肝細胞がアルブミンを生産していることが確認された。

上記の長期維持に関する良好な結果はコラーゲン薄膜を介さずに直接、線維芽細胞のフィーダー層上に肝細胞を播種することによっても得られた

が、コラーゲン薄膜を用いた方が肝細胞の取扱等に便利である。

前記 (4) で得た細胞培養物を、DMSO 等の凍結保護剤とともに液体窒素で凍結してキット化することもできる。

特開昭62-285781(4)

手続補正書(自発)

昭和61年7月28日

特許庁長官 黒田明雄 殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第129419号

2. 発明の名称

細胞の培養法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

住所 東京都中央区日本橋三丁目14番10号

名称 (283) 第一製薬株式会社

代表者 鈴木 正

4. 代理人

住所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)  
共同ビル 電話(669)090448

氏名 (6870) 弁理士 有賀 三

住所 同上

氏名 (7756) 弁理士 高野 登志雄

住所 同上

氏名 (8632) 弁理士 小野 信夫

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細の「発明の名称」の欄

7. 補正の内容

(1) 発明の名称を「細胞の培養法」と訂正する。

Translation of Claim 1 of JP 62-A-285781

(1) A method of culturing hepatic cells, which is characterized in that hepatic cells are planted to a feeder layer of fibroblasts whose proliferation capability is terminated by X-ray irradiation.